

Susceptibilidad antifúngica en dermatofitos

Antifungal Susceptibility of Dermatophytes

**Colella, María Teresa¹; Castro, María ²;
Montiel, Marvia²; Vásquez, Erika²;
Mata-Essayag, Sofía¹; Magaldi, Sylvia¹;
Hartung de Capriles, Claudia¹; Pérez, Celina¹;
Olaizola, Carolina¹ y Arántza, Roselló¹**

¹Sección de Micología Médica, Instituto de Medicina Tropical, Facultad de Medicina, UCV. ²Estudiantes de la Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, UCV. E-mail: chartung@cantv.net

Resumen

No existe hasta los momentos una prueba estandarizada para realizar la susceptibilidad antifúngica de los dermatofitos. El objetivo de este estudio fue implementar la técnica de los pozos de difusión para el estudio de la susceptibilidad de los dermatofitos. Se utilizaron un total de 100 aislados de dermatofitos (74 *Trichophyton rubrum*, 18 *Trichophyton mentagrophytes*, 1 *Trichophyton tonsurans*, 5 *Microsporum canis* y 2 *Epidermophyton floccosum*) provenientes de muestras clínicas aisladas e identificadas en la Sección de Micología Médica, IMT. Se empleó la técnica de los pozos de difusión con los siguientes antimicóticos: Griseofulvina, Terbinafina, Fluconazol e Itraconazol. Se aplicaron los criterios de interpretación acordados por la NCCLS. El inóculo, se estandarizó utilizando el peso como unidad. El medio Agar Staib demostró ser el más adecuado, al obtenerse un mejor crecimiento de los aislados en un 97 %. Esta es la primera vez, que se utiliza el peso como medida para cuantificar el inóculo en los dermatofitos. La mayor sensibilidad se evidenció ante Terbinafina seguido de Griseofulvina e Itraconazol. No se demostró sensibilidad alguna ante el Fluconazol. Sin embargo se requieren más estudios en los cuales se relacione la susceptibilidad “*in vitro*” con los resultados “*in vivo*”.

Palabras clave: Susceptibilidad, dermatofitos, *in vitro*.

Abstract

There are no test standardized for the antifungal susceptibility of dermatophytes. The aim of this study is to probe the well diffusion technique as antifungal susceptibility test for dermatophytes. One hundred species of dermatophytes were isolated and identified (74 *Trichophyton rubrum*, 18 *Trichophyton mentagrophytes*, 1 *Trichophyton tonsurans*, 5 *Microsporum canis* and 2 *Epidermophyton floccosum*). in the Medical Micology Department of TMI. The antifungal sensitivity of the isolates of the dermatophytes to the drugs was carried out using the well diffusion technique. The antifungal agents tested were griseofulvin, terbinafine, itraconazole and fluconazole. Results were interpreted according to NCCLS breakpoints. The inoculum suspension was standardized by weight measurement. Agar Staib was considered the most suitable, because 97% of the isolates grew on it. This is the first time the inoculum suspension of dermatophytes is standardized by weight measurement. Terbinafine was found to be the most effective drug, followed by Griseofulvin and Itraconazole. Fluconazole were not found to be effective.

Key words: Susceptibility, dermatophytes, *in vitro*.

Introducción

Los dermatofitos son los hongos más importantes que producen micosis superficiales en el humano (1, 2, 3).

Las principales especies patógenas para el hombre, autóctonas en Venezuela son: *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans* y *Epidermophyton floccosum* (4).

Los antifúngicos usualmente utilizados para el tratamiento de estas micosis son: Griseofulvina, Terbinafina, Itraconazol y Fluconazol (5, 6).

Hasta hace dos décadas las pruebas de susceptibilidad para dermatofitos *in vitro* a los diferentes antifúngicos solo se empleaban ocasionalmente en laboratorios especializados.

En el caso de los dermatofitos y otros hongos filamentosos son varios los factores que dificultan un procedimiento estándar para medir *in vitro* la susceptibilidad antifúngica (7).

En este sentido el aspecto técnico más discutido, es el tipo y tamaño del inóculo. El manejo, recuento, dilución y transferencia de

hifas muestra un mayor grado de dificultad que el de las conidias, por lo que, por lo general, las técnicas de sensibilidad suelen realizarse con estas últimas. Sin embargo estudios realizados con *Aspergillus* spp demuestran, que la sensibilidad antifúngica obtenida utilizando conidias o hifas, no es significativamente diferente. Sin embargo, este aspecto no ha sido estudiado para los dermatofitos (8).

Otros factores que dificultan la estandarización de una técnica de susceptibilidad para este tipo de hongos son: la temperatura de crecimiento, composición del medio, pH y el tiempo de incubación (9, 10).

Por otra parte, algunos aislados de dermatofitos tienden a formar una gran extensión de hifas aéreas y conidias cuyas bases no quedan totalmente insertadas en el medio, no entrando en contacto con el antifúngico y por lo tanto quedando libres de la inhibición. Además existen algunas aislados de dermatofitos, especialmente *T. rubrum*, los cuales esporulan con mucha dificultad, y presentan "*in vitro*" un lento metabolismo que condiciona una lenta asimilación de nutrientes y por lo tanto del antifúngico (7).

Por lo anteriormente expuesto, la determinación de la susceptibilidad antifúngica en estos mohos presenta aún aspectos técnicos que deben ser unificados para lograr una prueba confiable, siendo el más importante, la estandarización del inóculo (11).

Hasta los momentos se dispone como técnica de referencias para el estudio de la susceptibilidad del documento M 38-P de la NCCLS (12).

Goh y col. en 1994 realizaron en Singapur un estudio de susceptibilidad antifúngica para dermatofitos usando el método de caldo de dilución a partir de una suspensión de hifas y esporas extraídas del medio Sabouraud, la cual resulta poco reproducible (13).

Andreas Gehrt y col en 1995, evaluaron el efecto del tamaño del inóculo de hongos filamentosos patógenos en el método de microdilución en caldo (CMI), concluyeron que el tamaño del inóculo representa una variable crítica para la estandarización (10). Jessup y col. en el año 2000 realizaron el primer intento de estandarizar una prueba de susceptibilidad antifúngica para dermatofitos. Logran mejorar la esporulación y crecimiento en el medio de Agar Oatmeal (7).

En 1989 Magaldi diseña el método de los pozos de difusión (14) y en el año 2000 junto con otros colaboradores realiza un estudio preliminar con el método de los pozos de difusión para evaluar la susceptibilidad antifúngica de *C. carrionii*, *P. verrucosa* y *F. pedrosoi*. (15). También se utilizó este mismo método para ensayar la susceptibilidad de *Sporothrix schenckii* (16).

Por todo lo anteriormente mencionado el objetivo de este trabajo es implementar la técnica diseñada por Magaldi en el estudio de la susceptibilidad antifúngica de los dermatofitos.

Materiales y métodos

Para la realización del siguiente estudio se utilizaron un total de 100 aislados de dermatofitos (74 *Trichophyton rubrum*, 18 *Trichophyton mentagrophytes*, 1 *Trichophyton tonsurans*, 5 *Microsporum canis* y 2 *Epidermophyton floccosum*) provenientes de muestras clínicas de uñas y lesiones en piel de los pies. Los mismos fueron identificados por los métodos tradicionales (1, 2, 3) en la Sección de Micología Medica del Instituto de Medicina Tropical "Dr. Felix Pifano", Universidad Central de Venezuela.

Se realizó la técnica de los pozos de difusión, según las especificaciones de Magaldi y col, que se basan en la preparación de un inóculo del hongo y la utilización de 20 mL de un medio de cultivo que se funde y mantiene a 55°C en baño de maría. El inóculo se mezcla con el medio de cultivo. En cada placa, se practica orificios pequeños de 5mm de diámetro cada uno con un perforador metálico. En los mismos se deposita 20 µL del antifúngico a evaluar, después de 24 horas de incubación, se mide en milímetros, el diámetro de la zona clara de inhibición del crecimiento.

En el presente trabajo se estudian otros medios de cultivos a parte del medio de Casitone tales como lo es el medio de Staib.

Otra variante en la ejecución de la técnica fue la preparación del inóculo.

Los dermatofitos se cultivaron en el medio Lactritmel (1) a temperatura ambiente (24-30°C) por 20 días, a partir de estos cultivos se preparó una suspensión en 2,5 mL en medio Casitone líquido. Esta suspensión se mantuvo a temperatura ambiente por 8 días, tiempo necesario para obtener la fase logarítmica de crecimiento de los mismos. Después de este tiempo, la suspensión se centrifugó

por 10 min a 1257 rpm. Se descartó el sobrenadante obteniéndose sedimentos variables entre 400-1000 l, los cuales se resuspendieron en tubos con 2 mL de agua destilada estéril. Para obtener el peso del inóculo, se registró la diferencia del peso antes y después de transferir el inóculo al tubo. El peso se utilizó como medida para cuantificar el inóculo.

Se ensayaron los siguientes antimicóticos en su presentación comercial: Griseofulvina, Terbinafina, Fluconazol e Itraconazol, en una concentración de 1.25 µg/µL para llegar a una concentración final en el pozo de 25 µg/ pozo. Se aplicaron los criterios de interpretación acordados por la NCCLS, en la técnica de difusión de discos en Agar para Imidazoles y se midieron los halos de inhibición en mm (15, 17).

Resultados

La estandarización estableció que el medio de Agar Staib, pH 5.5, era el más idóneo para realizar la susceptibilidad antifúngica de los dermatofitos, porque produjo halos de inhibición más nítidos y de mayor diámetro comparado con el medio Casitone, igualmente se evidenció que en el mismo medio el crecimiento de los dermatofitos fue mayor, en un 97% en comparación al 64% con el medio Casitone. La temperatura ideal para realizar la prueba fue de 35°C. Con respecto al inóculo el mejor crecimiento, se obtuvo con un peso que oscilaba entre 0.651-0.850 g, los cuales producían halos nítidos y bien delimitados en la placa de Petri (Figura 1, Foto 1).

En el medio de Agar Staib 84.7% del total de los aislados de *T. rubrum* (Figura 2) que crecieron, fueron sensibles a Terbinafina, 43% a Griseofulvina, 22,2% al Itraconazol y ninguno al Fluconazol. En el medio de Casitone se observó que de un total de 44 aislados que crecieron, el 18.2% mostró ser sensible a

Terbinafina, un 6.8% a Griseofulvina y un 4.55% al Itraconazol.

En cuanto a *T. mentagrophytes* (n=18) (Figura 3), que crecieron en el medio de Agar Staib se observó que un 38.9%, eran sensibles a Terbinafina, 27.8% a Griseofulvina, mientras que ninguno de los aislados mostró susceptibilidad al Itraconazol o Fluconazol. De un total de 15 cepas crecidas en el medio Casitone, 20% fueron susceptibles a Griseofulvina, 13.3% a Terbinafina e Itraconazol y ninguna al Fluconazol.

El único aislado disponible de *T. tonsurans* solo creció en el medio Agar Staib y solo fue sensible a la Terbinafina.

Para el crecimiento *M. canis* en Agar Staib (n=4) y en Casitone (n=3), mostró una susceptibilidad a Terbinafina del 75% en Agar Staib y solo 66.7% para Casitone, seguido de Griseofulvina con un 25% sensibilidad en Staib y 33.3% en Casitone, ningún aislado fue sensible al Fluconazol e Itraconazol.

Para *E. floccosum* utilizando el medio Agar Staib (n=2), el 50% de los aislados evaluados demostró ser sensible solo a Terbinafina y el aislado restante tuvo sensibilidad intermedia frente a Fluconazol, Griseofulvina e Itraconazol. Mientras que en el medio Casitone 50 % fue sensible a Terbinafina y Griseofulvina, 50% mostró sensibilidad intermedia a Fluconazol y ninguna al Itraconazol.

Se pudo demostrar que la mayor sensibilidad “*in vitro*” alcanzada por los diferentes dermatofitos fue con la Terbinafina, seguida por la Griseofulvina e Itraconazol, la más baja sensibilidad se observó con Fluconazol.

Discusión

Para el correcto tratamiento de las dermatofitosis, es conveniente poder disponer de métodos de referencia para la determinación *in vitro* de la sensibilidad antifúngica de

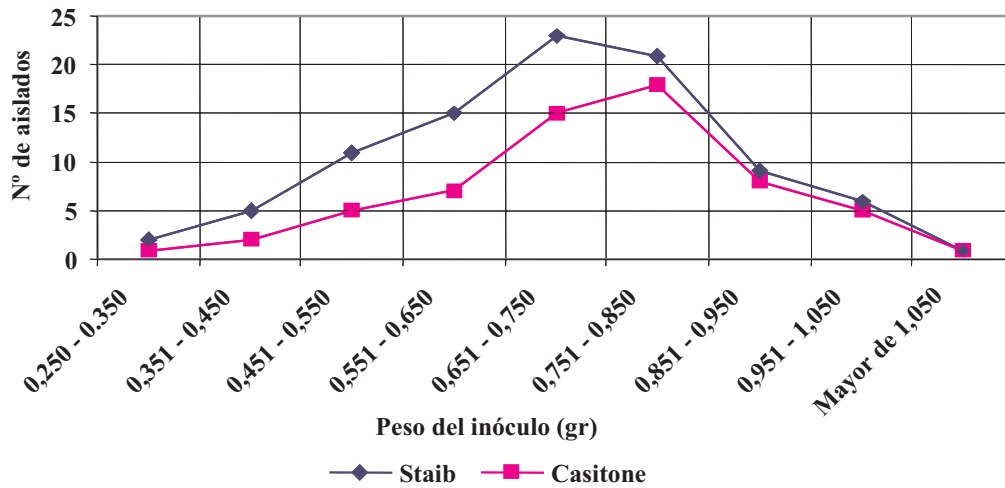


Figura 1. Crecimiento en los medios de acuerdo al peso del inóculo.

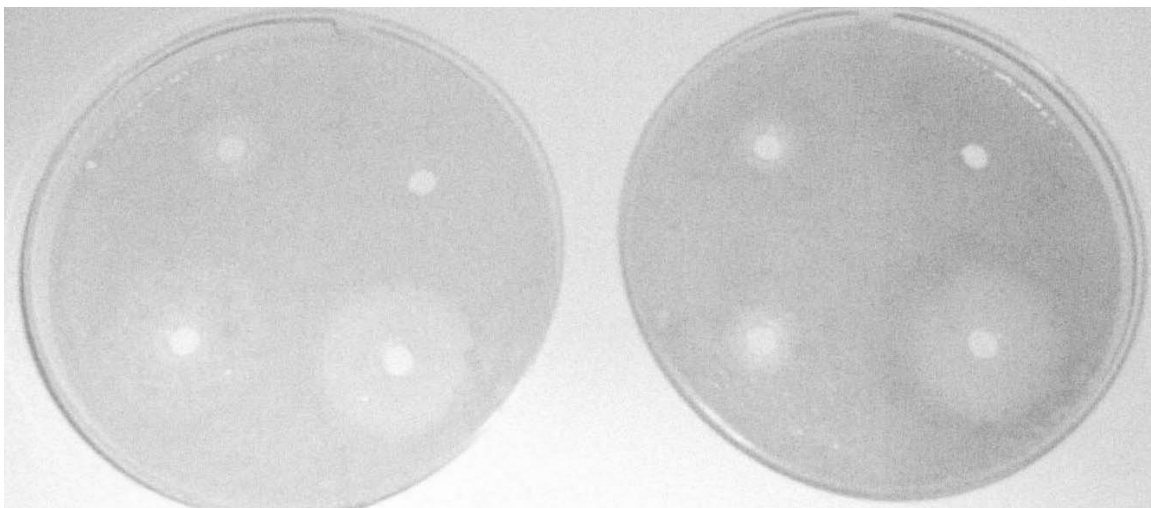


Foto 1. Susceptibilidad antifúngica para *T. rubrum*, en el medio Agar Staib.

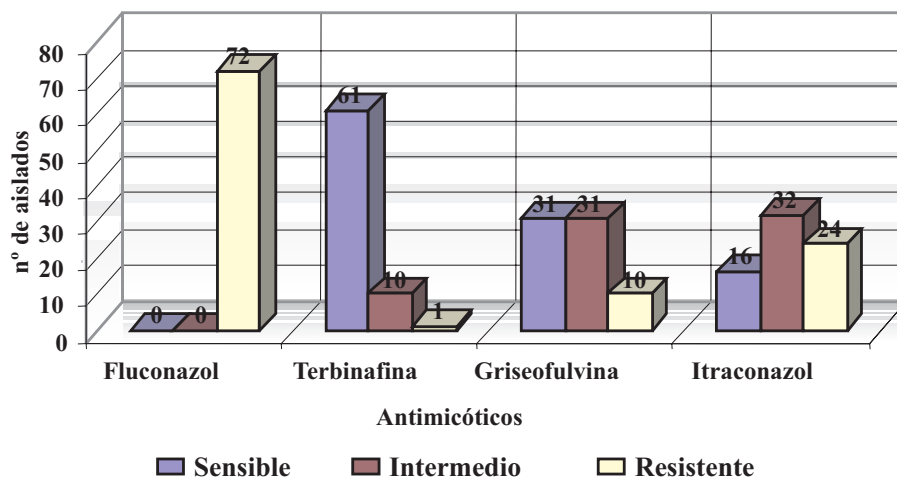


Figura 2. Sensibilidad en el medio Agar Staib para 72 aislados de *T. rubrum*.

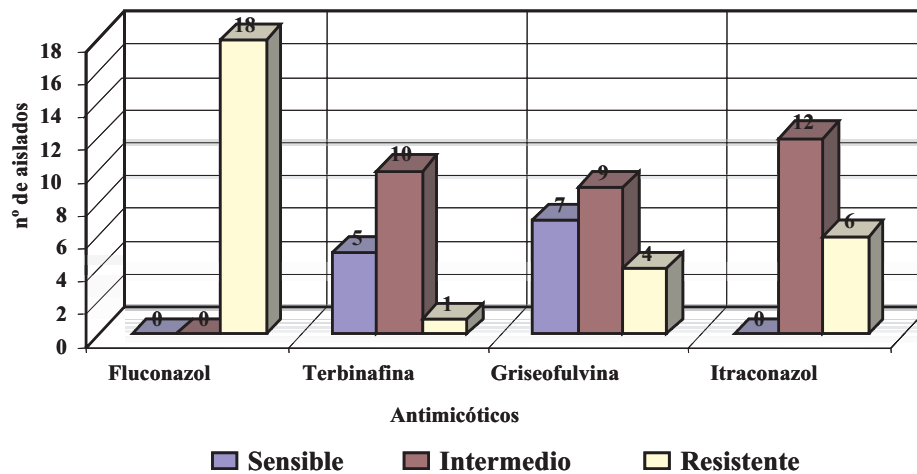


Figura 3. Sensibilidad en el medio Agar Staib para 18 aislado de *T. mentagrophytes*.

los aislamientos clínicos, que permitan obtener datos reproducibles y confiables al elegir el fármaco más activo. En la literatura internacional en su mayoría, la concentración del inóculo para las pruebas de sensibilidad “*in vitro*” de hongos filamentosos se mide mediante espectrofotometría (13, 18, 19) y la prueba de susceptibilidad se realiza con la técnica de microdilución en caldo, la cual presenta problemas de reproducibilidad inter laboratorios (7, 11, 13, 18). En nuestro estudio la técnica de los pozos de difusión, una técnica similar a la de los discos de difusión, la cual permite utilizar los antifúngicos a evaluar en su presentación comercial, mostró ser una posible opción adicional, modificando el medio de cultivo y utilizando el peso como medida para cuantificar el inóculo.

Los resultados obtenidos en nuestro análisis evidenciaron que el medio Agar Staib (pH 5.5) demostró ser el más adecuado para realizar la prueba de susceptibilidad de los pozos de difusión, al obtenerse un mejor crecimiento de los aislados en un 97% de los casos en comparación con el medio de Casitone (pH 7.0), en donde el crecimiento fue del 64 %, así mismo la temperatura óptima de incubación fue de 35°C. No tenemos una explica-

ción satisfactoria que justifique que los parámetros antes mencionados sean los más favorables y desconocemos que propiedades tiene el Agar Staib que puedan favorecer el crecimiento de los dermatofitos.

Por otro lado, uno de los aspectos técnicos más controvertidos para el desarrollo de la técnica de la sensibilidad antifúngica en los dermatofitos, es la preparación del inóculo, que presenta una serie de dificultades inherentes a la morfología de estos hongos tal como fue anteriormente mencionado en la introducción de este trabajo. En nuestro estudio el rango de entre 0.651 g a 0.850 g, equivalentes a 800 µL de suspensión de inóculo, permitió un buen crecimiento de los aislados de *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*. Curiosamente, con *M. canis* y *E. floccosum*, se obtuvieron también excelentes resultados con pesos menores (0.475 g a 0.575 g); una posible explicación para este hecho puede ser que *M. canis* y *E. floccosum*²⁰ poseen abundantes macroconidias lo que permite que con un menor peso el tamaño de inóculo sea también efectivo, en contraste con las especies de *Trichophyton* que poseen pocas macroconidias y abundantes microconidias.

Esta es la primera vez, a la luz de nuestros conocimientos que se utiliza el peso como medida para cuantificar el inóculo en los dermatofitos con la finalidad de realizar una prueba de susceptibilidad antifúngica.

Se pudo demostrar que la mayor sensibilidad "in vitro" alcanzada por los diferentes dermatofitos fue con la Terbinafina, seguida por la Griseofulvina e Itraconazol, no se demostró sensibilidad alguna ante el Fluconazol.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Goh y col. en 1994 (13), dos trabajos reportados por Jessup y col., en el año 2000 (7, 19) arrojan datos que colocan a la Terbinafina como el antifúngico de mayor actividad contra los dermatofitos en la actualidad.

Sin embargo, se requieren más estudios en los cuales se utilice los mismos parámetros que se usaron en este trabajo, el cual fue un ensayo, para determinar si realmente esta es una técnica efectiva para realizar la susceptibilidad antifúngica de los dermatofitos. Además, se necesitan estudios de correlación "in vitro" e "in vivo", indispensables para la predicción de la respuesta clínica ante un tratamiento.

Referencias Bibliográficas

- (1) Marcano C., Mata-Essayag S., Zamora F., Muñoz F., Landaeta ME., Montes T. y col. Examen micológico. Micosis superficiales. Guía de trabajos prácticos de microbiología. Caracas: Cátedra de Microbiología. Facultad de Medicina. Escuela Luis Razetti, UCV. 2003. pp.157-167.
- (2) Mata-Essayag S. Micosis. Clasificación. Micosis superficiales. En: Nuñez MJ., Gómez MJ., Carmona O., Editores. Microbiología Médica, 2^{da} Ed. Caracas: Ediciones y publicaciones Vicerrectorado Académico UCV. 1997. pp. 581-611 3.
- (3) Rippon J. Dermatophytosis and dermatomycosis. Medical Mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1986. pp.154-248.4.
- (4) León MI. Dermatofitosis. En: Delgado M., Bastardo M., Barroeta S., Batistini F., Borelli D., Pérez M. y col, Editores. Temas de Micología Médica. Caracas: MSAS. 1996. pp.31-63.
- (5) Terrel CL. Antifungal agents. Part II. The azoles. Mayo Clin Proc 1999; 74:78-100.3.
- (6) Georgii A and Korting H. Antifungal susceptibility testing with dermatophytes. Mycoses. 1991;34:193-1999.
- (7) Jessup C., Warner J., Isham N., Hasan I. and Ghannaoum M. Antifungal susceptibility testing of dermatophytes: Establishing a medium for inducing conidial growth and evaluation of susceptibility of clinical isolates. J Clin Microbiol. 2000;38(1):341-344.
- (8) Guarro J., Llop C., Aguilar C., Pujol I. Comparison in vitro antifungal susceptibilities of conidia and hyphae of filamentous fungi. Antimicrob Agents Chemother. 1997; 41:2760-2762.
- (9) Fernández B., Pereiro Jr M., Llovo J., Otero X., Toribio J. Influencia del tiempo de incubación en la determinación antifúngica "in vitro" de la terbinafina frente a *Trichophyton rubrum*. Rev Ibero Micol 1998;15:290-293.
- (10) Gehrt A., Peter J., Pizzo P., Walsh T. Effect of increasing inoculum sizes of pathogenic filamentous fungi on MICs of antifungal agents by broth microdilution method. J Clin Microbiol. 1995;33 (8):1302-1307.
- (11) Espinel-Ingroff A., Bartlett M, Bowden R., Chin NX., Cooper Jr C., Fothergill A. y col. Multicenter evaluation of proposed standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. J Clin Microbiol. 1997;35(1):139-143.
- (12) National Committee for Clinical Laboratory Standards 2002. Reference Method for Broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium forming filamentous fungi.; proposes standard document M. 38-P NCCLS Wayne Pennsylvania 1998.
- (13) Goh CL., Tay Y., Ali K. *In vitro* evaluation of griseofulvina, ketoconazole and itraconazole against various dermatophytes in Sin-

- gapure. Int J Dermatol 1994; 33(10):733-737.
- (14) Magaldi S, Mata S, Camero T, Ríos A. Pruebas de sensibilidad de *Candida albicans* frente a los antimicóticos de uso comercial. Bol Soc Venez Microbiol 1998;18(1):16-20.
- (15) Magaldi S, Mata S, Camero T, Marcano C, Hartung C. Determinación de la sensibilidad antifúngica en agentes de cromomicosis mediante la técnica de los pozos de difusión. Antib e Infec Pfizer. 1999;7(1):17-20.
- (16) Van Cutsem J. "In vitro" and "in vivo" activity of itraconazol. Med Klin 1991;85(1):5-8.
- (17) Magaldi S, Mata-Essayag S, Hartung C, Pérez C, Colella MT, Olaizola C y col. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. Internat J Infect Diseases. 2004;8:39-45.
- (18) Espinel-Ingroff A, Dawson K, Pfaller M, Anaissie E, Breslin E, Fothergill A, et al Comparative and collaborative Evaluation of Standardization of antifungal Susceptibility Testing for Filamentous Fungi. Antimicrob Agents Chemother 1995;39(2):314-319.
- (19) Jessup C, Ryder N, Ghannoum M. An evaluation of the in vitro activity of terbinafine. Med Mycol 2000;38:155-159.
- (20) Awoderu VA, Nebo GC and Otudero VO. Occurrence of dermatomycoses and in-vitro therapeutic efficacy of three antifungal drugs on the growth of *Epidermophyton floccosum*. Mycopathologia 2003;156:295-301.